



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C12Q 1/68		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/66772 (43) Date de publication internationale: 9 novembre 2000 (09.11.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/01198</p> <p>(22) Date de dépôt international: 4 mai 2000 (04.05.00)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 99/05651 4 mai 1999 (04.05.99) FR</p> <p>(71) Déposants (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): ESCARY, Jean-Louis [FR/FR]; 881, avenue de la Gare, F-77310 Saint-Fargeau-Ponthierry (FR). BECKMANN, Jacques [FR/FR]; 95, rue de Paris, F-94220 Charenton-le-Pont (FR).</p> <p>(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée</p> <p><i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i></p>	

(54) Title: METHOD FOR DETECTING BY DHPLC A DIFFERENCE OF DNA GENOTYPE AND/OR SEQUENCE

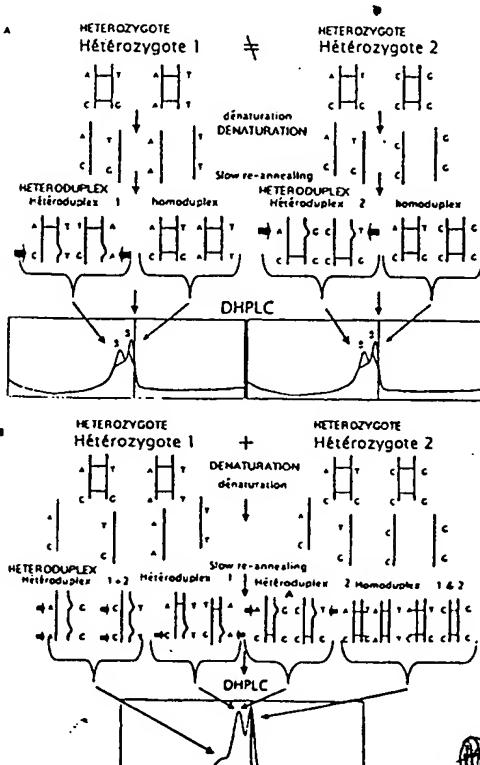
(54) Titre: PROCEDE DE DETECTION PAR DHPLC D'UNE DIFFERENCE DE GENOTYPE ET/OU DE SEQUENCE D'ADN

(57) Abstract

The invention concerns a method for detecting by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) a difference of genotype or of sequence between a reference heterozygous or homozygous natural or artificial DNA sample for a genomic fragment of interest and a heterozygous or homozygous natural or artificial DNA sample to be tested for said genomic fragment of interest. The invention also concerns the use of said method for genetic diagnosis of a disease and for searching and/or identifying polymorphism or a sequence variation for a genomic fragment of interest.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet un procédé de détection par chromatographie liquide haute performance dénaturante (DHPLC) d'une différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'ADN naturel ou artificiel hétérozygote ou homozygote de référence pour un fragment génomique d'intérêt et un échantillon d'ADN naturel ou artificiel hétérozygote ou homozygote à tester pour ledit fragment génomique d'intérêt. L'invention comprend également l'utilisation de ce procédé pour le diagnostic génétique de maladie ainsi que pour la recherche et/ou l'identification de polymorphisme ou d'une variation de séquence pour un fragment génomique d'intérêt.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TC	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	CN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Irlande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark						
EE	Estonie						

PROCEDE DE DETECTION PAR DHPLC D'UNE DIFFERENCE DE GENOTYPE ET/OU DE SEQUENCE D'ADN

5 La présente invention a pour objet un procédé de détection par chromatographie liquide haute performance dénaturante (DHPLC) d'une différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'ADN naturel ou artificiel hétérozygote ou homozygote de référence pour un fragment génomique d'intérêt et un échantillon d'ADN naturel ou artificiel hétérozygote ou homozygote à tester pour ledit fragment 10 génomique d'intérêt. L'invention comprend également l'utilisation de ce procédé pour le diagnostic génétique de maladie ainsi que pour la recherche et/ou l'identification de polymorphisme ou d'une variation de séquence pour un fragment génomique d'intérêt.

La connaissance du génome humain permet de générer actuellement une multitude d'informations. Pour exploiter au mieux ces informations en particulier pour 15 la recherche de nouvelle cible et molécule thérapeutique, il existe aujourd'hui un grand besoin de disposer de nouveaux critères permettant d'établir les liens entre la découverte de mutation d'un gène et son implication dans une pathologie. La connaissance également de l'ensemble des polymorphismes associés à un ou plusieurs fragments génomiques d'intérêt pour une population donnée permettrait notamment 20 d'établir ces liens et d'étudier et de prévoir la tolérance d'un individu à un nouveau traitement thérapeutique.

La recherche de ces liens ainsi que le diagnostic génétique de maladies liées à la présence d'une mutation pathogène nécessitent de disposer également de méthode 25 d'analyse efficace à haute capacité permettant d'effectuer une recherche systématique d'une anomalie de séquence dans un fragment d'ADN préamplifié.

Parmi les méthodes actuellement les plus utilisées pour la recherche de polymorphisme ou de mutation, on peut citer la SSCP (« Single Strand Conformation Polymorphism) et ses variantes, la DGGE (électrophorèse en condition dénaturante), le clivage chimique ou le séquençage direct du fragment d'ADN d'intérêt. Néanmoins, 30 ces méthodes, qui reposent sur la détection d'un signal positif pour le fragment

(polymorphisme, mutation ou simple variation génétique de séquence), ne sont pas toujours capables de détecter toutes les anomalies ponctuelles. De plus, ces méthodes sont particulièrement lourdes et coûteuses pour leur utilisation dans le domaine du diagnostic génétique ou de la découverte de nouveaux polymorphismes ou mutations à grande échelle.

Une nouvelle technique DHPLC a été récemment décrite pour la recherche systématique de mutation ou de polymorphisme dans un fragment d'ADN (Kuklin et al., *Genetic Testing*, 1 (3), 201-206, 1997 ; Wanguo Liu et al., *Nucleic Research*, 26 (6), 1396-1400, 1998). Cette méthode de détection par chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante (DHPLC) qui repose sur la séparation en gradient d'élution et en conditions dénaturantes d'un produit d'amplification d'un acide nucléique permet de distinguer par analyse du profil la présence d'hétéroduplex et d'homoduplex, ou de distinguer, si les profils sont suffisamment différents, deux hétéroduplex de nature différente. Cette distinction entre hétéroduplex et homoduplex, ou entre hétéroduplex permet notamment de détecter la présence d'ADN mutant à partir de produit d'amplification résultant d'un mélange dénaturé puis réhybridé de produit d'amplification d'ADN sauvage et d'ADN mutant homozygote, ou résultant du produit d'amplification d'un ADN mutant hétérozygote dénaturé puis réhybridé.

Dans l'extrême majorité des cas, le type de profil obtenu avec les systèmes DHPLC est dépendant de la nature et de la position du ou des polymorphisme(s) (constatation de l'expérience).

Néanmoins, la méthode DHPLC ainsi décrite ne permet pas de détecter la présence d'un polymorphisme, de mutation ou de variation génétique de séquence porté par un fragment d'ADN hétérozygote et non par un ADN hétérozygote de référence pour ledit fragment, lorsque les deux types d'hétérozygotes donnent le même profil DHPLC.

En effet, il n'est pas rare, même si ce cas est minoritaire, de rencontrer deux ADN hétérozygotes de génotype différent présentant le même profil DHPLC ou des profils très proches difficilement interprétables. Ceci est particulièrement préoccupant si l'on imagine que l'un des polymorphismes non identifiables est une mutation

par exemple où ce procédé DHPLC est utilisé comme technologie de détection de mutation appliquée au diagnostic génétique, comme ceci sera illustré ci-après dans l'exemple concernant une mutation CADASIL. Pour pouvoir distinguer les deux types d'hétéroduplex, il reste le séquençage qui n'est pas toujours infaillible et reste coûteux 5 pour détecter et pour identifier ces polymorphismes.

Par conséquent, il existe un grand besoin aujourd'hui de disposer d'un procédé fiable de haute capacité et peu coûteux permettant de détecter ou de confirmer une mutation, un polymorphisme ou une variation génétique de séquence, naturelle ou artificielle, porté par un ADN hétérozygote lorsque l'ADN de référence, naturel ou 10 artificiel, est hétérozygote.

Ceci est justement l'objet de la présente invention.

Les auteurs de la présente invention ont de manière tout à fait inattendue mis en évidence que le mélange du produit d'amplification d'un ADN hétérozygote à tester avec celui d'un ADN hétérozygote de référence pour un fragment génomique d'intérêt 15 suivie d'une dénaturation et d'une hybridation, permettait de détecter par DHPLC en condition dénatrante la présence d'une mutation, d'un polymorphisme ou d'une variation génétique de séquence porté par l'ADN hétérozygote à tester même lorsque les deux ADN hétérozygotes présentaient séparément le même profil DHPLC. Cette méthode selon l'invention s'est avérée efficace pour distinguer une mutation 20 CADASIL (maladie CADASIL) d'un polymorphisme non fonctionnel situé dans le même fragment. La mutation située dans le gène Notch 3 à l'état hétérozygote donne le même profil en DHPLC qu'un polymorphisme non fonctionnel situé dans le même fragment ADN également à l'état hétérozygote, alors que la méthode DHPLC décrite dans l'art antérieur ne permettant pas de les distinguer. Cette mutation étant de plus 25 difficilement identifiable par séquençage.

La méthode selon la présente invention a pour principe de multiplexer les produits d'amplification des échantillons d'ADN hétérozygotes donnant les mêmes profils en mélangeant lesdits produits d'amplification, puis en les dénatrant et en les réhybridant, et d'analyser ensuite sur DHPLC en condition dénatrante les produits 30 d'amplification ainsi réhybridés. Ainsi, comme le montre la figure 1, le mélange de

génotype redonnera le même hétérozygote et donc les mêmes hétéroduplex qui donneront le même profil en DHPLC que les produits d'amplification des échantillons d'ADN hétérozygotes testés séparément. Par contre, le mélange de deux produits d'amplification de deux échantillons d'ADN hétérozygotes différents générera en plus 5 de nouvelles espèces d'hétéroduplex qui feront que le profil correspondant au mélange différera des profils des deux produits d'amplification des échantillons d'ADN hétérozygotes testés séparément.

Ainsi, la présente invention concerne un procédé de détection par chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante (DHPLC) d'une 10 différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'ADN hétérozygote de référence pour un fragment génomique d'intérêt et un échantillon d'ADN hétérozygote à tester pour ledit fragment génomique d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la dénaturation :
- 15 a) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est égal à un, d'un mélange d'un produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote de référence avec un produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote à tester ; ou
- 20 b) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est au moins égal à deux, d'un mélange de chaque produit d'amplification d'un échantillon des ADN hétérozygotes à tester avec un produit d'amplification de l'échantillon d'ADN hétérozygote de référence ;
- b) l'hybridation du mélange dénaturé des produits d'amplification obtenus à l'étape a) ;
- 25 c) la réalisation du profil DHPLC pour le mélange hybridé des produits d'amplification obtenus à l'étape b) ; et
- d) a) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est égal à un, la mise en évidence de ladite différence de génotype ou de séquence par comparaison du profil obtenu à l'étape c) avec un profil DHPLC obtenu pour un produit d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote de référence pour ledit 30

Par « méthode de chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante », dénommée DHPLC, appliquée ici à un échantillon contenant de l'ADN, 10 on entend désigner dans la présente description une méthode de séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC) dans laquelle la séparation de l'ADN contenu dans l'échantillon est effectuée sous condition de dénaturation thermique au moins partielle de cet ADN.

15 De telles méthodes permettent en particulier de différencier à partir du profil de séparation obtenu (courbe d'absorbance en fonction du temps de rétention du composé détecté), dénommé ci-après profil DHPLC, des composés homoduplex de composés hétéroduplex (Kuklin et al., Genetic Testing, 1 (3), 201-206, 1997 ; Wangyu Liu et al., Nucleic Research, 26 (6), 1396-1400, 1998).

20 Parmi les méthodes de chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante, on peut citer mais sans s'y limiter la méthode telle que décrite dans Kuklin et al., 1997, et Wanguo Liu et al., 1998, incorporant le système automatique d'analyse de fragment d'ADN WAVE™ de la société Transgenomic Inc. (Sunny Clara, CA, USA) comprenant une matrice polymérique à haute résolution de type DNA Ascp™ en condition partiellement dénaturante ou des méthodes incorporant des systèmes équivalents d'analyse automatique de fragments d'ADN comprenant des colonnes à haute résolution de type HP (Hewlett Packard) tels que les systèmes proposés par la société Varian (Système Helix™Prostar).

Par « dénaturation » d'un échantillon d'ADN, on entend désigner le processus visant à séparer deux brins d'ADN appariés, ne nécessitant pas la rupture de liaisons covalentes. En général, la dénaturation de l'ADN se produit et est réalisée dans un

certains composés facilitant la déstabilisation des liaisons hydrogènes, telles que les cations, et/ou en fonction de la composition en bases (teneur en bases G-C) et/ou également en fonction du degré d'appariement des brins à dénaturer.

Compte tenu de ces paramètres, il sera nécessaire d'évaluer préalablement en 5 fonction du fragment d'ADN (longueur, composition en bases), les conditions de séparation optimales des ADN homoduplex des ADN hétéroduplex par la méthode DHPLC, telles qu'en particulier la température optimale d'analyse et/ou le gradient de tampons utilisé pour la séparation. Les méthodes permettant d'optimiser ces paramètres en fonction du fragment génomique d'intérêt choisi sont bien connues de 10 l'homme de l'art et ne seront pas développées ici (cf. par exemple : Taylor et al., Application note N° 101, Transgenomic Inc., Santa Clara, CA, USA ; Kuklin et al., Genetic Testing, 1 (3), 201-206, 1997).

Par fragment génomique d'intérêt, on entend désigner d'une part :

- tout fragment naturel d'acide nucléique simple ou double brins, ADN ou 15 ARN, compris dans le génome d'une cellule eucaryote (animale, végétale ou levure), procaryote (bactérie, mycoplasme ou autres), d'un virus ou d'une organelle sur lequel fragment on recherche une mutation, un polymorphisme ou de manière générale une variation de séquence par rapport à une séquence nucléique de référence pour ledit fragment naturel d'acide nucléique ;

20 ainsi que d'autre part :

- tout fragment artificiel d'acide nucléique double brins, ADN ou ARN, résultant de l'hybridation non naturel entre un premier brin d'ADN ou d'ARN d'une cellule eucaryote ou procaryote, d'un virus ou d'une organelle avec un second brin d'ADN ou d'ARN d'une cellule eucaryote ou procaryote, d'un virus ou d'une 25 organelle complémentaire du premier brin sur lequel fragment on recherche une mutation, un polymorphisme ou de manière générale une variation de séquence par rapport à une séquence nucléique de référence pour ledit fragment artificiel d'acide nucléique ;

ledit fragment génomique d'intérêt étant utilisé comme matrice d'ADN ou 30 d'ARN double brins pour l'amplification, la connaissance de ladite séquence de

référence permettant l'élaboration d'amorces à partir desquelles ledit fragment naturel ou artificiel d'intérêt, pourra être amplifié.

Lorsque le fragment génomique d'intérêt est de type ARN, la réaction d'amplification réalisée à partir de cette matrice sera précédée par une étape de 5 transcription inverse (comme par exemple la technique dénommée RT-PCR).

Parmi lesdits fragments génomiques d'intérêt correspondant à des fragments naturels d'acide nucléique double brins, on peut citer par exemple les fragments issus de génome de cellules de mammifère, notamment humaines, de cellule végétale, de parasite, de levure, de bactérie, de mycoplasme, de virus, ou d'organelle, dont le 10 génome est constitué d'ADN ou d'ARN double brins.

Parmi cesdits fragments génomiques d'intérêt correspondant à des fragments naturels d'acide nucléique double brins, on préfère de façon particulière les fragments génomiques de gène codant pour un marqueur génétique, une partie régulatrice ou une partie promotrice d'un gène ou pour une protéine, notamment la partie transcrive d'un 15 gène et sa partie traduite, notamment les gènes dont la présence de mutation détermine directement ou conjointement avec un ou plusieurs autres gènes une pathologie ou le risque d'une pathologie, ou encore les fragments génomiques dont la connaissance de l'ensemble de leurs polymorphismes dans une population donnée permet de répertorier des classes de population présentant ou pouvant présenter une réponse spécifique à un 20 composé thérapeutique donné.

On préfère également lesdits fragments génomiques d'intérêt contenant une séquence transgénique dont la détection fera l'objet de l'invention, les ADN à tester pouvant être issus d'organisme transgénique, tel que des animaux ou plantes transgéniques, ou issus de cellules ou micro-organismes transformés ou recombinants.

Parmi lesdits fragments génomiques d'intérêt correspondant à des fragments artificiels d'acide nucléique double brins, on peut citer par exemple, mais sans s'y limiter, les fragments résultant de l'hybridation non naturelle entre :

- un premier brin d'ADN issu d'une cellule d'un tissu donné d'un organisme, notamment d'un mammifère, codant pour un gène d'intérêt avec un second brin 30 d'ADN complémentaire du premier brin issu d'une cellule d'un même organisme.

mais d'un autre tissu et dont la séquence, codant pour le gène équivalent présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ;

5 - un premier brin d'ADN ou d'ARN d'une cellule humaine, celle-ci pouvant être transformée, codant pour un gène d'intérêt avec un second brin d'ADN ou d'ARN complémentaire du premier brin issu d'une cellule animale non humaine (rat, souris, etc.) et dont la séquence, codant pour le gène équivalent présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ;

10 - un premier brin d'ADN ou d'ARN d'une cellule humaine transformée par un virus pathogène (HIV, virus hépatiques, HBV, HCV, HDV, ou autres) avec un second brin d'ADN ou d'ARN complémentaire du premier brin issu du même virus ;

15 - un premier brin d'ADN ou d'ARN d'une souche animale, végétale, de levure, d'une bactérie, d'un mycoplasme, d'un parasite ou d'un virus, codant pour un gène d'intérêt avec un second brin d'ADN ou d'ARN complémentaire du premier brin issu d'une autre souche du même organisme et dont la séquence présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ;

20 - un premier brin d'ADN ou d'ARN d'une organelle de type mitochondrie ou chloroplaste codant pour un gène d'intérêt issu d'un premier individu avec un second brin d'ADN ou d'ARN complémentaire du premier brin issu ou préparé à partir d'un autre individu et dont la séquence présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ;

25 - un premier brin d'ADN ou d'ARN d'une cellule animale ou végétale codant pour un gène d'intérêt avec un second brin d'ADN ou d'ARN complémentaire du premier brin issu d'une cellule transformée d'un même animal ou végétal, par exemple issu d'un animal ou plante transgénique (rat, souris, plante d'intérêt industriel, etc.) et dont la séquence, codant pour le même gène a été modifiée et présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ; ou

30 tout fragment artificiel d'acide nucléique double brins dont chacun des deux brins peut être indépendamment l'un de l'autre d'origine multiple formant une matrice hétérozygote pour ledit fragment génomique d'intérêt.

30 Par échantillon d'ADN hétérozygote ou matrice hétérozygote pour ledit

naturel ou artificiel comprenant des ADN double brins présentant au moins un polymorphisme, une mutation ou une variation de séquence entre les différents brins qui le ou la composent.

5 Parmi les échantillons d'ADN hétérozygote naturel pour un fragment génomique d'intérêt, on préfère tout particulièrement les échantillons d'ADN issus d'organisme diploïde, notamment les échantillons d'ADN hétérozygote issus de cellules eucaryotes ou de virus diploïdes, et dont lesdits fragments génomiques d'intérêt correspondent à des fragments naturels d'acide nucléique double brins, pouvant comporter ou non des fragments de séquence transgénique (ou transgène ou 10 séquence hétérologue).

Parmi les échantillons d'ADN hétérozygote artificiel pour un fragment génomique d'intérêt, on préfère les échantillons d'ADN hétérozygote provenant des fragments génomiques artificiels.

15 Par échantillon d'ADN hétérozygote ou matrice hétérozygote naturelle ou artificielle de référence pour ledit fragment génomique d'intérêt, on entend désigner un échantillon d'ADN hétérozygote provenant d'un fragment génomique naturel ou artificiel pour ledit fragment génomique d'intérêt capable de former après amplification, un produit d'amplification qui après dénaturation et hybriddation forme un mélange d'homoduplex et d'hétéroduplex dont le profil DHPLC obtenu sert de 20 profil de référence.

25 Par produit d'amplification d'un échantillon d'ADN, on entend désigner le produit, ou un échantillon dudit produit, obtenu après un ou plusieurs cycles (dénaturation, hybridation et élongation) au cours desquels la quantité d'ADN cible correspondant au fragment génomique d'intérêt a été augmentée, tel que par exemple les produits obtenus par les techniques d'amplification élective par réaction en chaîne à la polymérase (PCR) ou ses variantes (NASBA™, etc.).

30 Dans le procédé de détection selon l'invention, on entend par « réalisation du profil DHPLC », l'étape comprenant la séparation des ADN formant des homoduplex ou des hétéroduplex en conditions au moins partiellement dénaturantes et l'établissement du profil DHPLC.

Par différence de génotype ou de séquence, on entend désigner toute variation de la séquence d'un acide nucléique à tester par rapport à une séquence nucléique de référence, ladite variation résultant de la délétion, l'insertion ou la substitution d'au moins un nucléotide de la séquence nucléique de référence, l'acide nucléique à tester pouvant être issu d'un fragment génomique d'une même population que l'acide nucléique de référence (intra-espèce), ou être issu d'un fragment génomique d'une même population que l'acide nucléique de référence mais issu par exemple d'une cellule d'un tissu différent de celui dont est issu l'acide nucléique de référence (inter-tissus au sein d'une même espèce), ou encore issu d'un fragment génomique d'une population différente de celle dont est issu l'acide nucléique de référence (inter-espèce, par exemple Homme/animal, à l'exception de l'Homme, tel que Homme/souris, Homme/rat, Homme/singe, Homme/nématode ou Homme/drosophile, Homme/virus, ou encore souris/rat, cellule transformée/cellule non transformée, cellule animale ou végétale issue d'un organisme naturel/cellule animale ou végétale issue d'un organisme transgénique etc.).

Le procédé selon l'invention permet également de détecter par DHPLC une différence de génotype ou de séquence pour un fragment génomique d'intérêt entre un échantillon d'ADN hétérozygote de référence et au moins un échantillon d'ADN hétérozygote parmi plusieurs échantillons d'ADN hétérozygote à tester dont les produits d'amplification sont mélangés avant de réaliser le profil DHPLC.

En effet, la méthode DHPLC est suffisamment sensible pour détecter la présence d'hétéroduplex obtenus après hybridation différents de ceux obtenus pour l'échantillon de référence même après dilution de ces hétéroduplex due au mélange des produits d'amplification de l'ensemble des échantillons d'ADN hétérozygote à tester avec le produit d'amplification de l'échantillon d'ADN hétérozygote de référence.

Cette variante du procédé selon l'invention peut être avantageusement utilisée dans des applications où il est habituellement nécessaire d'effectuer systématiquement le séquençage d'un fragment d'ADN donné afin de déterminer la présence d'un ou de plusieurs polymorphismes, de mutation ou de variation de séquence et ce pour un

le séquençage d'un groupe d'échantillons d'ADN par une seule analyse DHPLC lorsque le profil obtenu pour le mélange des produits d'amplification issus de ce groupe présente un profil identique au profil DHPLC du produit d'amplification de l'ADN hétérozygote de référence pour le fragment génomique d'intérêt. En effet, le 5 seul séquençage de l'ADN hétérozygote de référence suffit alors à identifier les génotypes de tous les échantillons d'ADN hétérozygote à tester dont les produits d'amplification ont été mélangés.

Une telle variante peut être avantageusement utilisée dans le domaine du diagnostic à grande échelle d'une maladie d'origine génétique, d'une prédisposition 10 d'origine génétique à un caractère donné ou à une maladie, ou encore pour déterminer un ou plusieurs polymorphismes dans une population donnée associés à la tolérance ou non à un composé thérapeutique donné.

Une telle variante peut être en outre avantageusement utilisée pour déterminer 15 l'ensemble des polymorphismes présents sur un ou plusieurs fragments génomiques d'intérêt dans une population donnée nécessitant habituellement d'effectuer systématiquement le séquençage du ou des fragments d'ADN pour chacun des individus.

De préférence, le procédé de détection selon la présente invention est caractérisé en ce que le nombre d'échantillons d'ADN hétérozygote à tester pour le 20 fragment génomique d'intérêt est compris entre 1 et 10, de préférence entre 1 et 5, extrémités comprises, de manière encore plus préférée égal à 1.

L'invention comprend également un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que la séquence nucléique du fragment génomique d'intérêt est connue.

25 Par connaissance d'une séquence nucléique, on entend désigner la connaissance au moins d'un fragment de ladite séquence, ou d'un fragment situé à proximité de ou chevauchant ladite séquence permettant d'élaborer une ou un jeu de plusieurs amorces à partir de laquelle ou desquelles sera initiée l'amplification du fragment génomique d'intérêt des échantillons d'ADN hétérozygote à tester et de référence, et si nécessaire 30 le séquençage dudit fragment génomique d'intérêt, et/ou du séquençage dudit fragment

En effet, la connaissance de la séquence nucléique complète détaillée du fragment génomique d'intérêt, et/ou dudit fragment génomique d'intérêt des échantillons d'ADN hétérozygote à tester et de référence n'est pas ou ne sont pas toujours nécessaire(s), en particulier si le procédé selon l'invention est utilisé pour la 5 mise en évidence d'un nouveau ou des mêmes polymorphismes au sein d'une population donnée.

L'invention concerne également un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que la comparaison entre le profil DHPLC obtenu pour le produit d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote à tester et le profil DHPLC 10 obtenu pour le produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote de référence ne permet pas de détecter une différence de génotype ou de séquence pour ledit fragment génomique d'intérêt entre l'ADN hétérozygote de référence et l'ADN hétérozygote à tester.

L'invention concerne en outre un procédé de détection selon l'invention, 15 caractérisé en ce que le mélange des produits d'amplification de l'étape a) est effectué à partir de produit d'amplification desdits ADN obtenus séparément.

Ainsi, lorsque le nombre d'échantillons d'ADN hétérozygote à tester est égal à un, l'échantillon d'ADN hétérozygote de référence et l'échantillon d'ADN hétérozygote à tester seront amplifiés séparément puis les deux produits 20 d'amplification obtenus seront mélangés avant l'étape a) de dénaturation.

Lorsque le nombre d'échantillons d'ADN hétérozygote à tester est supérieur à un, les échantillons d'ADN hétérozygote à tester et l'ADN hétérozygote de référence seront amplifiés séparément puis les produits d'amplification seront mélangés avant l'étape a) de dénaturation.

25 La présente invention comprend également un procédé selon l'invention caractérisé en ce que le mélange des produits d'amplification de l'étape a) est obtenu directement par amplification simultanée desdits échantillons d'ADN.

Ainsi, lorsque le nombre d'échantillons d'ADN hétérozygote à tester est égal à un, l'échantillon d'ADN hétérozygote de référence et l'échantillon d'ADN 30 hétérozygote à tester seront préalablement mélangés puis amplifiés simultanément,

permettant ainsi d'obtenir directement le mélange des deux produits d'amplification avant l'étape a) de dénaturation.

Lorsque le nombre d'échantillons d'ADN hétérozygote à tester est supérieur à un, les échantillons d'ADN hétérozygote à tester et l'échantillon d'ADN hétérozygote de référence seront également préalablement mélangés, puis amplifiés simultanément avant l'étape a) de dénaturation.

De manière préférée, l'invention est relative à un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que les échantillons d'ADN hétérozygote pour un fragment génomique d'intérêt sont choisis parmi les échantillons d'ADN issus d'organisme diploïde, notamment parmi des échantillons d'ADN issus de deux tissus différents d'un même organisme diploïde.

De manière préférée, l'invention est relative également à un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que le fragment génomique d'intérêt est choisi parmi les fragments génomiques d'intérêt correspondant à des fragments naturels d'acide nucléique double brins, lesdits fragments naturels comportant éventuellement un fragment de séquence transgénique.

Sous un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé d'identification d'au moins une mutation, d'un polymorphisme ou d'une variation de séquence porté par la séquence nucléique d'un échantillon d'ADN hétérozygote à tester pour un fragment génomique d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) la détection par DHPLC d'une différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'un ADN hétérozygote de référence dont on connaît la séquence nucléique pour ledit fragment génomique d'intérêt et ledit échantillon d'ADN hétérozygote à tester par un procédé de détection selon l'invention ;
- 25 b) le séquençage de la séquence nucléique de l'échantillon d'ADN hétérozygote à tester ;
- c) l'identification de la mutation, du polymorphisme ou de la variation de séquence porté par la séquence nucléique de l'échantillon d'ADN hétérozygote à tester par comparaison de sa séquence avec la séquence nucléique de l'ADN hétérozygote de référence.

5 L'invention comprend également un procédé de confirmation d'une différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'ADN hétérozygote de référence pour un fragment génomique d'intérêt et un échantillon d'ADN hétérozygote à tester pour ledit fragment génomique d'intérêt, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un procédé de détection selon l'invention ou un procédé d'identification selon l'invention.

10 Selon la présente invention, les procédés de détection, d'identification ou de confirmation selon l'invention pourront être utilisés pour la recherche d'une mutation connue ou inconnue dans un fragment génomique d'intérêt ou pour le diagnostic génétique de maladies liées à la présence d'une mutation pathogène, pour le diagnostic génétique de prédisposition à des maladies liées à la présence d'une mutation pathogène ou de prédisposition à un caractère donné.

15 Sous un autre aspect, l'invention comprend également l'utilisation d'un procédé de détection, d'un procédé d'identification ou d'un procédé de confirmation selon la présente invention, pour la mise en évidence d'au moins un polymorphisme, de l'ensemble des polymorphismes dans une population donnée ou de toute variation de séquence portée par un fragment génomique d'intérêt, notamment pour la pharmacogénétique et pour la constitution d'une carte de marqueurs génétiques ou encore pour la mise en évidence d'une séquence transgénique portée par un fragment génomique d'intérêt.

20 Le procédé selon l'invention constitue une amélioration très importante apportée à la capacité de détection des colonnes de DHPLC pour distinguer différents polymorphismes, mutations ou variations de séquence dans un même fragment d'ADN lorsque ceux-ci ne peuvent être différenciés sans mélange d'individus hétérozygotes. De plus, elle offre une garantie supplémentaire de ne pas confondre deux individus 25 hétérozygotes si elle est appliquée en routine en complément du séquençage pour identifier des différences entre hétérozygotes. Cette méthode peut être ainsi appliquée d'une part dans le domaine du diagnostic, où cette méthode apporte à la combinaison DHPLC/séquençage la meilleure garantie actuelle de fiabilité.

30 D'autre part, le procédé selon l'invention peut être également utilisé systématiquement à la détection et l'identification de nouveaux polymorphismes,

mutations ou variations de séquence, pour assurer la découverte plus efficace de ces polymorphismes, mutations ou variations génétiques de séquence par DHPLC.

Enfin, en plus d'un gain de fiabilité, le procédé selon l'invention fait réaliser des économies significatives de coût de séquençage pour le diagnostic, la découverte 5 de polymorphismes, de mutations ou de variations de séquence.

En effet, garantissant une efficacité maximale de détection de polymorphismes différents, le séquençage de tous les individus hétérozygotes n'est plus nécessaire pour identifier l'intégralité des polymorphismes, mutations ou des variations de séquence portés par un fragment ADN et dans une population donnée. Seul le séquençage d'un 10 individu hétérozygote correspondant à chaque famille de profils différents obtenus en DHPLC après multiplexage est désormais nécessaire pour identifier tous les polymorphismes et/ou mutations porté(e)s par les différents hétérozygotes d'une population pour un fragment ADN donné.

Ainsi, le procédé selon l'invention fait réaliser une économie considérable à 15 tout programme de détection de mutation, polymorphismes ou variation de séquence connus ou inconnus dans une population donnée.

Par exemple, pour un fragment d'ADN et une population d'individus donnés, différentes familles de profils hétérozygotes seront distinguées après analyse de chaque individu pris séparément. Puis, pour une même famille un individu de référence sera 20 choisi et mélangé aux autres membres de la famille selon le procédé de l'invention, puis chaque mélange sera analysé en DHPLC selon le procédé de l'invention. Les profils de ces mélanges qui seront identiques aux profils des hétérozygotes analysés séparément permettront de conclure à l'identité des hétérozygotes mélangés.

Au contraire, lorsque ces mélanges donneront de nouveaux profils, il sera 25 conclu que un ou plusieurs hétérozygotes du mélange sont de génotype différent. En ne séquençant que les hétérozygotes de référence et les éventuels autres qui dans une même famille ont donné un profil nouveau après mélange avec l'hétérozygote de référence, l'intégralité des polymorphismes et/ou mutations portés dans le fragment ADN testé sera identifiée pour la population analysée.

L'invention concerne également l'utilisation des procédés selon l'invention pour la détection et l'identification de variation inter-tissulaire de séquence nucléique pour un fragment génomique d'intérêt.

Sous un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé de détection par chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante (DHPLC) d'une différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote de référence pour un fragment génomique d'intérêt et un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote à tester pour ledit fragment génomique d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

10 a) la dénaturation :

α) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est égal à un, d'un mélange d'un produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote ou homozygote de référence avec un produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote ou homozygote à tester ; ou

15 β) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est au moins égal à deux, d'un mélange de chaque produit d'amplification d'un échantillon des ADN hétérozygotes ou homozygotes à tester avec un produit d'amplification de l'échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote de référence ;

b) l'hybridation du mélange dénaturé des produits d'amplification obtenus à l'étape
20 a) ;

c) la réalisation du profil DHPLC pour le mélange hybridé des produits d'amplification obtenus à l'étape b) ; et

25 d) α) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est égal à un, la mise en évidence de ladite différence de génotype ou de séquence par comparaison du profil obtenu à l'étape c) avec un profil DHPLC obtenu pour un produit d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote de référence pour ledit fragment génomique d'intérêt ; ou

β) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est au moins égal à deux, la mise en évidence de la différence de génotype ou de séquence pour l'un au moins des échantillons d'ADN hétérozygote ou homozygote testés par

un produit d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote de référence pour ledit fragment génomique d'intérêt, suivi des étapes a) α), b), c) et d) α) pour chacun des échantillons d'ADN à tester ; et en ce que l'hybridation du mélange dénaturé des produits d'amplification obtenus à 5 l'étape b) résulte en la formation d'homoduplex ou d'hétéroduplex artificiels.

Par homoduplex ou hétéroduplex artificiels ci-avant mentionnés, on entend désigner un ADN double brins dont le premier brin, issu d'un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote d'un fragment génomique de cellule diploïde ou haploïde, telle que des cellules eucaryotes (animales ou végétales), parasite, 10 prokaryote ou de virus, ou encore d'organelle telle que les mitochondries ou chloroplastes, est hybridé avec le second brin dudit ADN double brins, ledit second brin étant issu d'un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote d'un fragment génomique d'une autre espèce de cellule diploïde ou haploïde ou d'une organelle de même espèce mais issu d'un autre individu, ou encore d'une cellule d'un même 15 organisme, mais issu d'un tissu différent.

Parmi lesdits homoduplex ou hétéroduplex artificiels, on peut citer par exemple, mais sans s'y limiter, les ADN double brins résultant de l'hybridation non naturelle entre :

- un premier brin d'ADN issu d'une cellule d'un tissu donné d'un organisme, 20 notamment d'un mammifère, codant pour un gène d'intérêt avec un second brin d'ADN complémentaire du premier brin issu d'une cellule d'un même organisme, mais d'un autre tissu et dont la séquence, codant pour le gène équivalent présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ;
- un premier brin d'ADN issu d'une cellule humaine, celle-ci pouvant être 25 transformée, codant pour un gène d'intérêt avec un second brin d'ADN complémentaire du premier brin issu d'une cellule animale (rat, souris, etc.) et dont la séquence, codant pour le gène équivalent présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ;
- un premier brin d'ADN issu d'une cellule humaine transformée par un virus 30 pathogène (HIV, virus hépatiques, HBV, HCV, HDV, ou autres) avec un second brin

- un premier brin d'ADN issu d'une cellule animale ou végétale codant pour un gène d'intérêt avec un second brin d'ADN complémentaire du premier brin issu d'une cellule transformée d'un même animal ou végétal, par exemple issu d'un animal ou plante transgénique (rat, souris, plante d'intérêt industrielle, etc.) et dont la séquence, 5 codant pour le même gène a été modifiée et présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ;
 - un premier brin d'ADN ou d'ARN d'une souche animale, végétale, de levure, d'une bactérie, d'un mycoplasme, d'un parasite ou d'un virus, codant pour un gène d'intérêt avec un second brin d'ADN ou d'ARN complémentaire du premier brin 10 issu d'une autre souche du même organisme et dont la séquence présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ;
 - un premier brin d'ADN ou d'ARN d'un organelle de type mitochondrie ou chloroplaste codant pour un gène d'intérêt issu d'un premier individu avec un second brin d'ADN ou d'ARN complémentaire du premier brin issu ou préparé à partir d'un 15 autre individu et dont la séquence présente un degré d'identité suffisant pour permettre l'hybridation des deux brins ; ou, de manière générale
 - tout fragment artificiel d'acide nucléique double brins dont les deux brins sont issus de fragments génomiques d'organisme ou de micro-organisme de nature différente.
- 20 Par échantillon d'ADN homozygote ou matrice homozygote pour ledit fragment génomique d'intérêt, on entend désigner un échantillon d'ADN double brins issu d'un organisme diploïde dont les deux allèles portant le fragment génomique d'intérêt sont identiques, ou issu d'un organisme ou micro-organisme ou virus ou organelle haploïde comportant une séquence unique pour le fragment génomique 25 d'intérêt.
- Par échantillon d'ADN homozygote ou matrice homozygote de référence pour ledit fragment génomique d'intérêt, on entend désigner un échantillon d'ADN homozygote pour ledit fragment génomique d'intérêt capable de former après amplification, des produits d'amplification qui après dénaturation et hybrideation 30 forment un mélange d'homoduplex dont le profil DHPLC obtenu sert de profil de

Parmi les échantillons d'ADN homozygote pour un fragment génomique d'intérêt, on préfère tout particulièrement les échantillons d'ADN issus d'organisme diploïde, notamment les échantillons d'ADN homozygote issus de cellules eucaryotes ou de virus diploïdes, ou encore issus d'organisme ou de micro-organisme haploïde, 5 notamment issus de procaryotes, de virus ou d'organelle telle que les mitochondries ou les chloroplastes, et dont lesdits fragments génomiques d'intérêt correspondent à des fragments naturels d'acide nucléique double brins ou monobrin, pouvant comporter ou non des fragments de séquence transgénique (ou transgène ou séquence hétérologue).

10 Bien entendu, lorsque l'un des deux brins dudit homoduplex ou hétéroduplex artificiel est issu d'un échantillon d'ARN correspondant à la transcription du fragment génomique d'intérêt (notamment un ARNm) ou d'un fragment génomique d'intérêt d'un organisme dont le génome est constitué d'un ARN (mono- ou bicaténaire), l'amplification sera précédée d'une étape dite de réverse transcription (RT-PCR).

15 Parmi les procédés de détection par DHPLC d'une différence de génotype ou de séquence entre échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote pour un fragment génomique d'intérêt selon l'invention et pour lequel procédé l'hybridation du mélange dénaturé des produits d'amplification obtenus à l'étape b) résulte en la formation d'homoduplex ou d'hétéroduplex artificiels, on préfère, de la même manière que 20 précédemment :

- un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que le nombre d'échantillons d'ADN hétérozygote ou homozygote à tester pour le fragment génomique d'intérêt est compris entre 1 et 10, de préférence entre 1 et 5, extrémités comprises, de préférence égal à 1 ;
- 25 - un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que la séquence nucléique du fragment génomique d'intérêt est connue ;
- un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que la comparaison entre le profil DHPLC obtenu pour le produit d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote à tester et le profil DHPLC obtenu 30 pour le produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote ou

l'edit fragment génomique d'intérêt entre l'ADN hétérozygote ou homozygote de référence et l'ADN hétérozygote ou homozygote à tester ;

- un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que le mélange des produits d'amplification de l'étape a) est effectué à partir de produit d'amplification desdits ADN obtenus séparément ;
- un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que le mélange des produits d'amplification de l'étape a) est obtenu directement par amplification simultanée desdits échantillons d'ADN ;
- un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que les échantillons d'ADN hétérozygote ou homozygote pour un fragment génomique d'intérêt sont choisis parmi les échantillons d'ADN issus d'organisme ou de micro-organisme diploïde ou haploïde ; ou
- un procédé de détection selon l'invention, caractérisé en ce que le fragment génomique d'intérêt est choisi parmi les fragments génomiques d'intérêt correspondant à des fragments naturels d'acide nucléique double brins ou simple brin pouvant comporter ou non des fragments de séquence transgénique.

L'invention concerne également l'utilisation des procédés selon l'invention pour la caractérisation de la variabilité génétique d'organismes haploïdes, tels que les mycoplasmes, bactéries, virus, levures, parasites ou organelles.

En effet, la variabilité des génomes des organismes ou micro-organismes haploïdes, que l'on considérera dans la présente description comme des organismes ou micro-organismes homozygotes, peut être mise en évidence et étudiée par le procédé selon l'invention en réalisant des hétéroduplex artificiels. Le mélange des produits d'amplification de l'étape a) du procédé selon l'invention pourra être effectué soit à partir de produit d'amplification des échantillons d'ADN obtenu séparément, soit à partir des produits d'amplification obtenus directement par amplification simultanée des échantillons d'ADN. Pour chaque mélange, un échantillon d'ADN (ou d'ARN qui sera ensuite transcrit en ADN) d'un individu ou d'une souche particulière sera pris comme référence pour la réalisation des hétéroduplex artificiels.

Bien entendu, la différence de génotype ou de séquence ainsi détectée pourra être identifiée ensuite par séquençage du fragment d'ADN d'intérêt et comparaison de la séquence obtenue avec la séquence de référence.

La caractérisation de la variabilité génétique de ces organismes ou micro-organismes haploïdes pourra être appliquée à la confection d'une carte entière de marqueurs génétiques de leur génome entier ou d'un gène particulier.

Ces cartes pourront être utilisées pour caractériser la liaison entre un ou plusieurs marqueurs et l'apparition d'un caractère pharmacogénétique donné. Ainsi, les procédés selon l'invention pourront permettre d'identifier un ou plusieurs marqueurs dont la présence est liée directement ou indirectement par exemple, mais sans s'y limiter, à un caractère de sensibilité ou de résistance d'un virus, d'un parasite, d'une levure ou d'une bactérie à un milieu donné (nutritif ou autre), à un agent antibiotique, à un phénomène naturel comme le froid, la chaleur, le besoin d'eau, le soleil ou l'obscurité, ou encore à son infectivité, sa virulence, son taux de recombinaison, son adaptabilité à ses hôtes, sa durée de latence, de survie, l'évolution de la maladie ou toutes autres applications dont la confection de ces cartes pourrait faire l'objet.

L'invention concerne également l'utilisation des procédés selon l'invention pour la caractérisation de la variabilité génétique inter-espèces pour des organismes ou micro-organismes diploïdes ou haploïdes.

Les procédés de détection, ou d'identification lorsqu'ils sont suivis d'une étape de séquençage, selon l'invention peuvent en effet permettre d'étudier les variations de séquences pour un gène donné qui a été conservé au cours de l'évolution.

Le mélange des produits d'amplification de l'étape a) du procédé selon l'invention pourra être effectué soit à partir de produit d'amplification des échantillons d'ADN obtenu séparément, soit à partir des produits d'amplification obtenus directement par amplification simultanée des échantillons d'ADN pour un fragment génomique d'intérêt correspondant à un gène conservé par exemple chez la souris, le rat, le singe, le chien, l'homme, le nématode ou la drosophile. Pour chaque mélange, un échantillon d'ADN (ou d'ARN qui sera ensuite transcrit en ADN) d'une espèce

La caractérisation des différences de génotype ou de séquence pour le gène d'intérêt pourra être utilisée dans le but d'identifier une liaison entre séquence et évolution d'une fonction codée par ce gène.

L'invention concerne également l'utilisation des procédés selon l'invention 5 pour la caractérisation de la variabilité génétique entre différentes souches pures d'une même espèce diploïde.

En effet, la caractérisation de telle variabilité génétique nécessite obligatoirement la réalisation d'hétéroduplex artificiels dans la mesure où les hétérozygotes naturels n'existent pas chez les souches pures (donc homozygotes) pour 10 caractériser les variations de séquences entre ces souches.

Les procédés de détection, ou d'identification lorsqu'ils sont suivis d'une étape de séquençage, selon l'invention peuvent en effet permettre d'étudier les variations de séquences pour un ou plusieurs gènes particuliers connus en fonction d'un caractère donné.

15 Le mélange des produits d'amplification de l'étape a) du procédé selon l'invention pourra être effectué soit à partir de produit d'amplification des échantillons d'ADN obtenu séparément, soit à partir des produits d'amplification obtenus directement par amplification simultanée des échantillons d'ADN pour un fragment génomique d'intérêt correspondant à un gène ou plusieurs gènes que l'on suppose liés 20 à un caractère donné, ou à une pathologie donnée.

Par exemple, mais sans s'y limiter, les procédés de détection ou d'identification selon la présente invention pourront permettre de détecter ou d'identifier les variations de séquences d'un ou plusieurs gènes que l'on suppose liés à la perte ou la pousse du poil, à la couleur du poil, à la taille, etc. (à un phénotype 25 bénin donné) ou à une pathologie comme par exemple l'athérosclérose. Par exemple, la souche murine pure C3H est résistante quand la souche murine pure C57B16 est sensible à l'athérosclérose. Le mélange des produits d'amplification d'ADN de ces souches, ADN correspondant à un gène soupçonné d'être lié à l'athérosclérose, permettra de caractériser la variation du gène en fonction de l'affection.

L'invention concerne également l'utilisation des procédés selon l'invention pour la caractérisation de la variabilité génétique entre différents génomes d'organelles telles que les chloroplastes chez les plantes ou mitochondries chez les animaux.

Les organelles sont en effet des entités extranucléaires avec un ADN 5 chromosomique distinct de l'acide nucléique nucléaire. Leur ADN code pour des gènes particuliers qui peuvent, lorsqu'ils sont mutés, être responsables de maladies. La transmission des organelles comme les mitochondries et donc des caractères qu'elles portent est non mendéienne. Par exemple chez l'homme, on hérite des mitochondries de sa mère, le spermatozoïde ne contribuant pas à la constitution des 10 mitochondries de l'oeuf et donc en conséquence des mitochondries de l'être développé. Certaines maladies dues à des mutations dans l'ADN mitochondrial sont donc dites maladies à transmission maternelle.

Le génome des organelles étant haploïde, la caractérisation de la variabilité de sa séquence dans une espèce donnée comme l'homme ne peut se faire qu'en réalisant 15 des hétéroduplex artificiels.

Le mélange des produits d'amplification de l'étape a) du procédé selon l'invention pourra être effectué de la même manière soit à partir de produit d'amplification des échantillons d'ADN de mitochondries obtenu séparément, soit à partir des produits d'amplification obtenus directement par amplification simultanée 20 des échantillons d'ADN de mitochondries pour un fragment génomique d'intérêt correspondant à un gène ou plusieurs gènes que l'on suppose liés à une pathologie ou à un caractère donné.

Par exemple, mais sans s'y limiter, les procédés de détection ou 25 d'identification selon la présente invention pourront permettre de détecter ou d'identifier les variations de séquences d'un ou plusieurs gènes de ces organelles que l'on suppose liés à un caractère donné tels que la photosynthèse pour les chloroplastes ou la respiration cellulaire pour les mitochondries, ou à un ou plusieurs gènes dont l'expression est liée à des maladies mitochondrielles à transmission maternelle, ou de faire une carte de marqueurs génétiques de ces organelles.

30 L'invention concerne également l'utilisation des procédés selon l'invention

En effet, certaines mutations de séquence nucléique d'un gène de cellules de tissu d'un organisme (animal ou végétal) et qui sont responsables directement ou indirectement de pathologie n'apparaissent pas dans les séquences nucléiques du même gène de cellules d'autres tissus du même organisme, comme par exemple des 5 mutations responsables de cancer chez l'homme ou l'animal ou responsables de tératome chez les plantes.

Le mélange des produits d'amplification de l'étape a) du procédé selon l'invention pourra être effectué de la même manière soit à partir de produit d'amplification des échantillons d'ADN de tissu sain et de tissu malade (qu'ils soient 10 homozygotes ou hétérozygotes) obtenu séparément, soit à partir des produits d'amplification obtenus directement par amplification simultanée des échantillons desdits ADN pour un fragment génomique d'intérêt correspondant à un gène ou plusieurs gènes que l'on suppose liés à la pathologie.

15 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

Légendes des figures

Figures 1A et 1B : Schéma explicatif théorique montrant que deux produits 20 d'amplification obtenus à partir de deux échantillons d'ADN hétérozygote (a : ADN de référence et b : ADN à tester) présentant entre eux une différence génotypique et donnant séparément le même profil en DHPLC (figure 1A) donnent, s'ils sont préalablement mélangés (multiplexage) un profil en DHPLC différent du profil obtenu pour l'échantillon d'ADN de référence (figure 1B) mettant ainsi en évidence la 25 présence d'une différence génotypique entre ces deux échantillons d'ADN hétérozygote.

Figures 2A à 2D : Les figures 2A à 2D représentent les profils obtenus par DHPLC réalisés sur le système automatique proposé par Transgenomic Inc. (WAVE™).

La figure 2A correspond au profil d'un hétérozygote pour une mutation CADASIL 30 pathogène (position B dans le fragment génomique d'intérêt).

Les figures 2B et 2C correspondent aux profils obtenus pour deux hétérozygotes pour un autre polymorphisme bénin (position A) présent également dans le même fragment génomique d'intérêt. Ce polymorphisme étant lui-même non pathogène (position A).

La figure 2D correspond au profil d'un homozygote sauvage pour le même fragment génomique amplifié.

On constate que les trois hétérozygotes 2A, 2B, 2C ont le même profil et que l'on ne peut distinguer le polymorphisme non pathogène du pathogène de cette manière.

Figures 3A à 3C : Les figures 3A à 3C représentent les profils obtenus par DHPLC réalisés sur le système WAVE™.

10 Les figures 3A et 3B correspondent aux profils obtenus séparément avec les deux hétérozygotes pour la position A.

La figure 3C correspond au profil obtenu avec le mélange des deux hétérozygotes des figures 3A et 3B.

Les trois profils sont identiques confirmant que les deux hétérozygotes sont identiques.

15 Figures 4A à 4C : Les figures 4A à 4C représentent les profils obtenus par DHPLC réalisés sur le système WAVE™.

La figure 4A correspond au profil obtenu avec un hétérozygote pour la position A.

La figure 4B correspond au profil obtenu avec l'hétérozygote pour la mutation CADASIL position B.

20 La figure 4C correspond au profil obtenu avec le mélange des deux hétérozygotes des figures 4A et 4B.

On distingue aisément que ce dernier profil est différent des deux autres qui sont identiques entre eux, ce qui montre bien que le mélange fait apparaître une différence de génotype avec la DHPLC que l'analyse séparée des deux hétérozygotes n'a pu montrer avec la même DHPLC.

Figures 5A et 5B : Les figures 5A et 5B représentent la comparaison entre deux profils obtenus avec deux types de mélanges d'hétérozygotes par DHPLC réalisés sur le système WAVE™.

La figure 5A représente le profil obtenu avec un mélange d'un hétérozygote pour la position A et d'un hétérozygote pour la mutation CADASIL en position B dans le

La figure 5B représente le profil obtenu avec un mélange de deux hétérozygotes pour le polymorphisme non pathogène présent en position A dans le même fragment génomique d'intérêt.

5 **EXAMPLE**

Matériel et méthodes

1) Echantillons d'ADN testés

Les échantillons d'ADN des individus hétérozygotes et homozygotes sauvages pour l'exon 3 du gène Notch 3 humain utilisés proviennent du groupe d'Elisabeth Tournier-Lasserve (INSERM U25, Hôpital Necker, Paris, France) :

- deux hétérozygotes pour la position A (nature du polymorphisme : transition C/T au nucléotide 381 du fragment génomique d'intérêt) ; et
- un hétérozygote pour la mutation CADASIL (position B : transition C/T au nucléotide en position nt 346 du fragment génomique d'intérêt) (Joutel et al., *Nature* 383 ; 707-710 ; 1996 ; Joutel et al., *The Lancet* 350 ; 1511-1515 ; 1997 ; Chabriat et al., *The Lancet* 346 ; 934-939 ; 1995).

2) Méthodes

a) Amplification PCR

Chaque ADN testé a été amplifié par PCR selon le protocole suivant sur un automate MJ RESEARCH Inc. (USA, PTC-225TM).

10 ng d'ADN génomique sont amplifiés par PCR avec deux amores spécifiques de l'exon 3 de Notch 3 humain selon un protocole classique et qui génère, après 35 cycles d'amplification, un produit de 224 paires de bases.

La taille et la qualité (pas de bande parasite) des fragments amplifiés peuvent être vérifiées sur gel d'agarose à 2 % par électrophorèse avant le test sur DHPLC.

Exemple 1 : exon 3 du gène Notch 3

1) Fragment PCR

Le fragment génomique d'intérêt dans cet exemple concerne un fragment de 224 paires de bases généré à partir de l'exon 3 du gène Notch 3 portant un polymorphisme ponctuel (transition C/T) à une certaine position (position A) sans

(position B) dans le fragment qui provoque la maladie CADASIL (Anne Joutel et al., Nature 383, 707-710, 1996).

2) PCR

Ce fragment est amplifié par PCR pour chacun des échantillons d'ADN issus des individus à diagnostiquer pour la présence de polymorphisme en position A ou B ou les deux, puis s'ensuit une dénaturation de ces produits PCR à 95°C pendant 3 min et une renaturation (ou hybridation) lente par refroidissement lent de - 1,6°C/minute pendant 45 minutes pour chacun des échantillons avant de les tester sur colonne DHPLC en conditions semi-dénaturantes (machine Transgenomic et colonne SARASEP™) suivant la méthode décrite après.

3) Conditions de détection pour DHPLC

- Appareillage WAVE™ Transgenomic/colonne SARASEP™ :
- Température de détection : 66°C : température déterminée empiriquement et qui est proche du Tm (température pour laquelle 50 % du fragment amplifié sont dénaturés) du fragment amplifié de 224 paires de bases. Par « empiriquement » on entend signifier qu'une courbe de fusion du fragment amplifié d'intérêt a été établie sur le WAVE™ en déterminant les temps de rétention d'un produit d'amplification sauvage pour ce fragment en fonction de différentes températures comprises entre 60°C et 70°C et selon un gradient défini grâce au temps de rétention dudit produit d'amplification soumis au gradient universel conseillé par le fabricant Transgenomic (procédure routinière).
- Gradient d'analyse utilisé à 66°C:

flux du gradient : 0,9 ml/minute.

	Temps (minute)	% tampon A	% tampon B
25	0,0	51	49
	0,1	46	54
	4,1	38	62
	4,2	0	100
	4,7	0	100
30	4,8	51	49

Tampon A : 0,1 molaire de triéthylammonium acétate (TEAA).

Tampon B : 0,1 molaire de TEAA/25 % acétronitrile (HPLC grade).

4) Multiplexage

L'un des deux hétérozygotes pour la position A est utilisé comme ADN 5 hétérozygote de référence pour les deux mélanges testés.

Les deux hétérozygotes de la position A d'une part et un hétérozygote de la position A avec l'hétérozygote de la position B sont mélangés d'autre part.

- 5 μ l du produit PCR de chaque hétérozygote sont mis dans un même tube (10 μ l final) puis le mélange est agité fortement au moyen d'un vortex, centrifugé puis 10 traité par dénaturation à 95°C pendant 3 min. suivi d'une étape de renaturation lente (- 1,6°C/minute pendant 45 minutes) avant d'être testé par DHPLC.

5) Résultats

Les figures 2A à 2D montrent que les trois hétérozygotes (deux pour la position A, un pour la position B) pris séparément ont le même profil et qu'ils ne 15 peuvent pas se distinguer sur la base de leur profil respectif obtenu en DHPLC.

Les figures 3A à 3C montrent que les deux profils obtenus avec les deux hétérozygotes pour la position A et celui obtenu avec leur mélange sont identiques confirmant que les deux hétérozygotes mélangés sont identiques.

Les figures 4A à 4C montrent que le profil obtenu avec le mélange de 20 l'hétérozygote pour la position A et l'hétérozygote pour la mutation CADASIL (position B) (figure 4A) est différent des profils obtenus avec les deux hétérozygotes pris séparément (figures 4A et 4B) qui sont identiques entre eux. Le mélange des hétérozygotes a donc permis de distinguer en DHPLC et à un coût plus faible que le séquençage d'un individu portant la mutation CADASIL d'un individu hétérozygote 25 pour un polymorphisme non pathogène.

Les figures 5A et 5B montrent la superposition des profils présentés en figures 4C (figure 5A) et 3C (figure 5B) pour stigmatiser les différences de profils obtenus lorsqu'on mélange deux hétérozygotes identiques (5B) et deux hétérozygotes de génotype différent (5A), alors que les hétérozygotes utilisés pour ces mélanges 30 présentent tous séparément le même profil DHPLC (figures 2A, 2B, 2C).

Le génotype de ces hétérozygotes n'est donc pas distinguable en DHPLC sans leur mélange.

Ces résultats montrent que la DHPLC permet de distinguer et/ou de confirmer une différence de génotype entre deux échantillons d'ADN hétérozygote dont les 5 profils obtenus séparément sont identiques en mélangeant au préalable les produits d'amplification de ces deux échantillons d'ADN selon le procédé de l'invention, et qu'ainsi la DHPLC utilisée selon le procédé de l'invention est un outil performant pour le diagnostic génétique de ce type de mutation ou pour la mise en évidence ou la découverte de polymorphisme.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détection par chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante (DHPLC) d'une différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'ADN hétérozygote de référence pour un fragment génomique d'intérêt et un échantillon d'ADN hétérozygote à tester pour ledit fragment génomique d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - a) la dénaturation :
 - α) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est égal à un, d'un mélange d'un produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote de référence avec un produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote à tester ; ou
 - β) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est au moins égal à deux, d'un mélange de chaque produit d'amplification d'un échantillon des ADN hétérozygotes à tester avec un produit d'amplification de l'échantillon d'ADN hétérozygote de référence ;
 - b) l'hybridation du mélange dénaturé des produits d'amplification obtenus à l'étape a) ;
 - c) la réalisation du profil DHPLC pour le mélange hybridé des produits d'amplification obtenus à l'étape b) ; et
 - d)
 - α) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est égal à un, la mise en évidence de ladite différence de génotype ou de séquence par comparaison du profil obtenu à l'étape c) avec un profil DHPLC obtenu pour un produit d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote de référence pour ledit fragment génomique d'intérêt ; ou
 - β) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est au moins égal à deux, la mise en évidence de la différence de génotype ou de séquence pour l'un au moins des échantillons d'ADN hétérozygote testés par comparaison du profil obtenu à l'étape c) avec un profil DHPLC obtenu pour un produit d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote de référence pour ledit

fragment génomique d'intérêt, suivi des étapes a) α), b), c) et d) α) pour chacun des échantillons d'ADN à tester.

2. Procédé de détection selon la revendication 1, caractérisé en ce que le nombre d'échantillons d'ADN hétérozygote à tester pour le fragment génomique d'intérêt est compris entre 1 et 10, de préférence entre 1 et 5, extrémités comprises.

3. Procédé de détection selon la revendication 2, caractérisé en ce que le nombre d'échantillons d'ADN hétérozygote à tester pour le fragment génomique d'intérêt est égal à 1.

4. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la séquence nucléique du fragment génomique d'intérêt est connue.

5. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la comparaison entre le profil DHPLC obtenu pour le produit d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote à tester et le profil DHPLC obtenu pour le produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote de référence ne permet pas de détecter une différence de génotype ou de séquence pour ledit fragment génomique d'intérêt entre l'ADN hétérozygote de référence et l'ADN hétérozygote à tester.

6. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le mélange des produits d'amplification de l'étape a) est effectué à partir de produit d'amplification desdits ADN obtenu séparément.

7. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le mélange des produits d'amplification de l'étape a) est obtenu directement par amplification simultanée desdits échantillons d'ADN.

8. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que les échantillons d'ADN hétérozygote pour un fragment génomique d'intérêt sont choisis parmi les échantillons d'ADN issus d'organisme ou de micro-organisme diploïde ou haploïde.

9. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les échantillons d'ADN hétérozygote de référence et à tester pour un fragment génomique d'intérêt sont choisis parmi des échantillons d'ADN issus de deux tissus

10. Procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que le fragment génomique d'intérêt est choisi parmi les fragments génomiques d'intérêt correspondant à des fragments naturels d'acide nucléique double brins.

11. Procédé de détection selon la revendication 10, caractérisé en ce que le 5 fragment naturel d'acide nucléique double brins comporte un fragment de séquence transgénique.

12. Procédé d'identification d'au moins une mutation, un polymorphisme ou d'une variation de séquence dans la séquence nucléique d'un échantillon d'ADN hétérozygote test pour un fragment génomique d'intérêt, caractérisé en ce qu'il 10 comprend les étapes suivantes :

a) la détection par DHPLC d'une différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'un ADN hétérozygote de référence dont on connaît la séquence nucléique pour ledit fragment génomique d'intérêt et ledit échantillon d'ADN hétérozygote test par un procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 15 11 ;

b) le séquençage de la séquence nucléique de l'échantillon d'ADN hétérozygote test ;
c) l'identification de la mutation, du polymorphisme ou de la variation de séquence porté par la séquence nucléique de l'échantillon d'ADN hétérozygote test par comparaison de sa séquence avec la séquence nucléique de l'ADN hétérozygote de 20 référence.

13. Procédé de confirmation d'une différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'ADN hétérozygote de référence pour un fragment génomique d'intérêt et un échantillon d'ADN hétérozygote à tester pour ledit fragment génomique d'intérêt, caractérisé en ce qu'il met en oeuvre un procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 11 ou un procédé d'identification selon la revendication 12.

14. Utilisation d'un procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 11, d'un procédé d'identification selon la revendication 12 ou d'un procédé de confirmation selon la revendication 13 pour la recherche d'une mutation connue ou inconnue dans un fragment génomique d'intérêt.

30 15. Utilisation d'un procédé de détection selon l'une des revendications 1 à

confirmation selon la revendication 13 pour le diagnostic génétique de maladie liée à la présence d'une ou plusieurs mutation(s) pathogène(s).

16. Utilisation d'un procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 11, d'un procédé d'identification selon la revendication 12 ou d'un procédé de confirmation selon la revendication 13 pour la mise en évidence d'au moins un polymorphisme ou une variation de séquence porté par un fragment génomique d'intérêt.

17. Utilisation d'un procédé selon la revendication 16 pour la constitution d'une carte de marqueurs génétiques.

18. Utilisation d'un procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 11, d'un procédé d'identification selon la revendication 12 ou d'un procédé de confirmation selon la revendication 13 pour la mise en évidence d'une séquence transgénique portée par ledit fragment génomique d'intérêt.

19. Utilisation d'un procédé selon l'une des revendications 16 à 18, pour la mise en évidence de l'ensemble des polymorphismes et/ou variations de séquence portés par au moins un fragment génomique d'intérêt dans une population donnée.

20. Utilisation d'un procédé selon la revendication 19 pour la pharmacogénétique

21. Utilisation d'un procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 11 et d'un procédé d'identification selon la revendication 12 pour la détection et l'identification de variation inter-tissulaire de séquence nucléique pour un fragment génomique d'intérêt.

22. Procédé de détection par chromatographie liquide haute performance en condition dénaturante (DHPLC) d'une différence de génotype ou de séquence entre un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote de référence pour un fragment génomique d'intérêt et un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote à tester pour ledit fragment génomique d'intérêt, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la dénaturation :

30 α) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est égal à un, d'un

ou homozygote de référence avec un produit d'amplification d'un échantillon dudit ADN hétérozygote ou homozygote à tester ; ou

5 b) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est au moins égal à deux, d'un mélange de chaque produit d'amplification d'un échantillon des ADN hétérozygotes ou homozygotes à tester avec un produit d'amplification de l'échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote de référence ;

b) l'hybridation du mélange dénaturé des produits d'amplification obtenus à l'étape
10 a) ;

c) la réalisation du profil DHPLC pour le mélange hybridé des produits
15 d'amplification obtenus à l'étape b) ; et

d) a) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est égal à un, la mise en
15 évidence de ladite différence de génotype ou de séquence par comparaison du
profil obtenu à l'étape c) avec un profil DHPLC obtenu pour un produit
d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote de
référence pour ledit fragment génomique d'intérêt ; ou

20 b) lorsque le nombre d'échantillons d'ADN à tester est au moins égal à deux,
la mise en évidence de la différence de génotype ou de séquence pour l'un au
moins des échantillons d'ADN hétérozygote ou homozygote testés par
comparaison du profil obtenu à l'étape c) avec un profil DHPLC obtenu pour
un produit d'amplification d'un échantillon d'ADN hétérozygote ou
homozygote de référence pour ledit fragment génomique d'intérêt, suivi des
étapes a) α), b), c) et d) α) pour chacun des échantillons d'ADN à tester ; et
en ce que l'hybridation du mélange dénaturé des produits d'amplification obtenus à
l'étape b) résulte en la formation d'homoduplex ou d'hétéroduplex artificiels.

25 23. Procédé d'identification d'au moins une mutation, un polymorphisme
ou d'une variation de séquence dans la séquence nucléique d'un échantillon d'ADN
hétérozygote ou homozygote test pour un fragment génomique d'intérêt, caractérisé en
ce qu'il comprend les étapes suivantes :

30 a) la détection par DHPLC d'une différence de génotype ou de séquence entre un
échantillon d'un ADN hétérozygote ou homozygote de référence dont on connaît la

d'ADN hétérozygote ou homozygote test par un procédé de détection selon la revendication 22 ;

b) le séquençage de la séquence nucléique de l'échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote test ;

5 c) l'identification de la mutation, du polymorphisme ou de la variation de séquence porté par la séquence nucléique de l'échantillon d'ADN hétérozygote ou homozygote test par comparaison de sa séquence avec la séquence nucléique de l'ADN hétérozygote ou homozygote de référence.

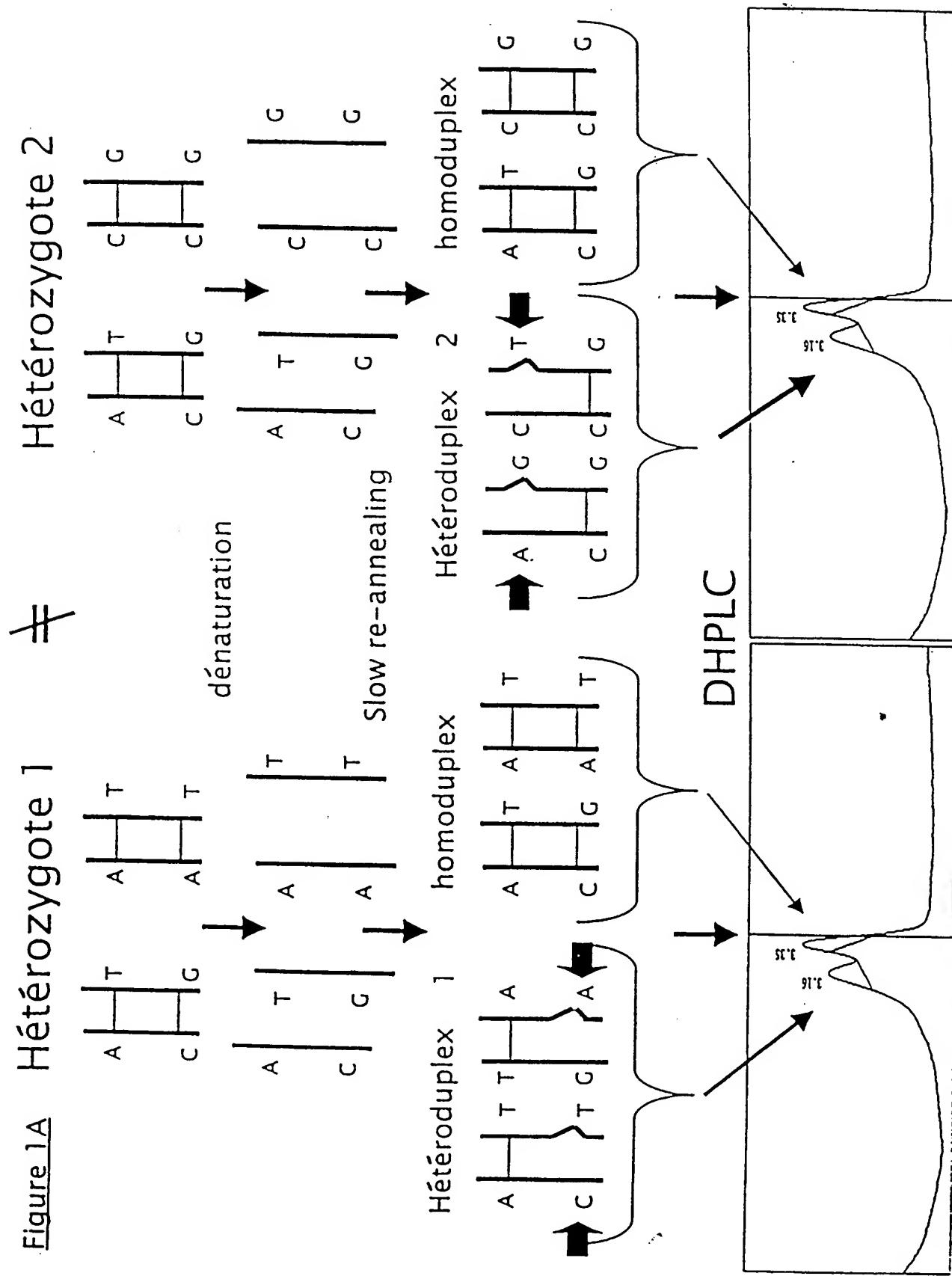
24. Utilisation d'un procédé de détection selon la revendication 22 ou d'un 10 procédé d'identification selon la revendication 23 pour la détection ou l'identification de variation de séquence pour au moins un fragment génomique d'intérêt dans les organismes ou micro-organismes haploïdes.

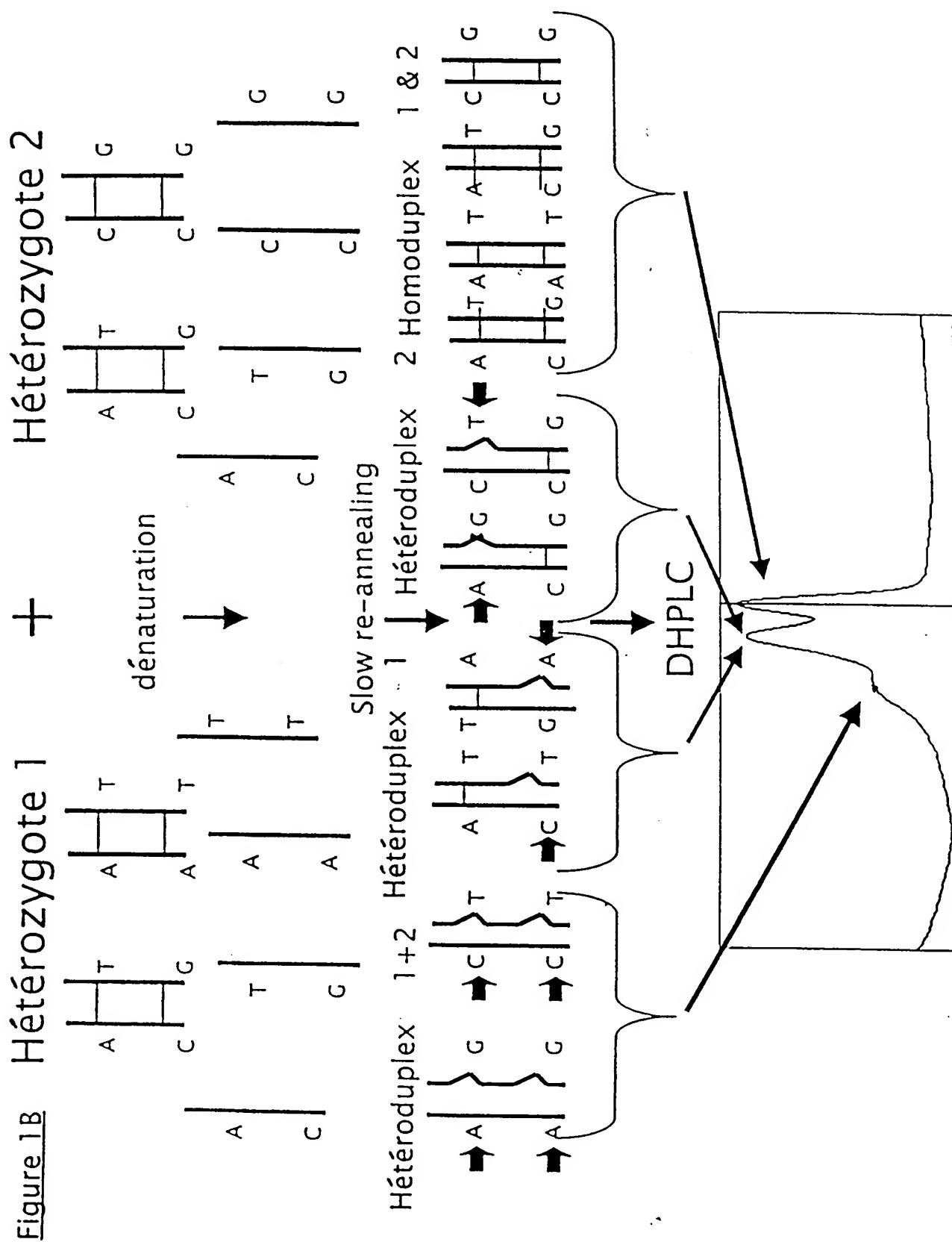
25. Utilisation d'un procédé selon la revendication 24, caractérisée en ce que les micro-organismes haploïdes sont des organelles.

15 26. Utilisation d'un procédé selon la revendication 24 ou 25 pour la constitution d'une carte de marqueurs génétiques.

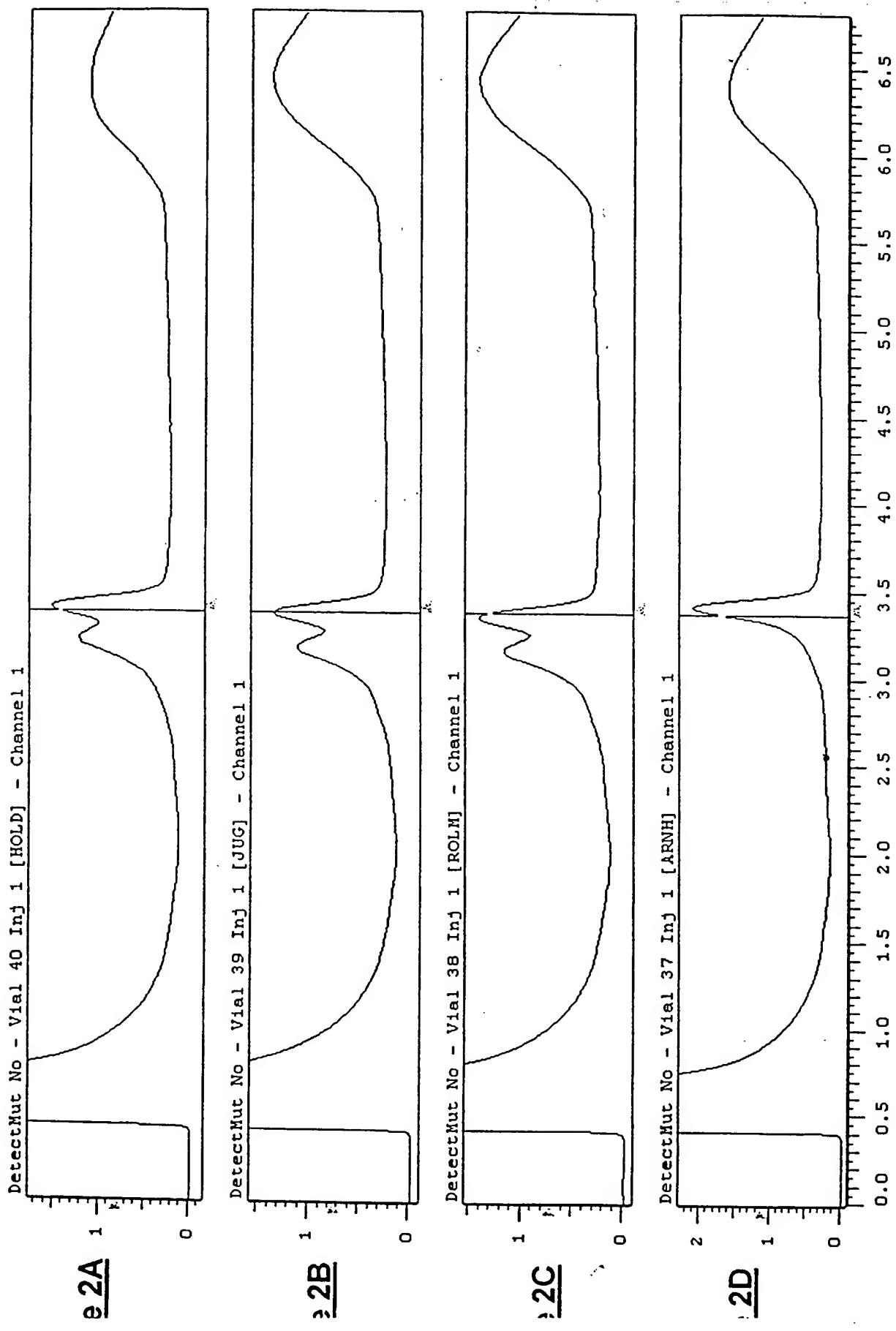
27. Utilisation d'un procédé de détection selon la revendication 22 ou d'un procédé d'identification selon la revendication 23 pour la détection ou l'identification de variation de séquence pour un fragment génomique d'intérêt entre des organismes 20 diploïdes.

28. Utilisation d'un procédé de détection selon la revendication 22 ou d'un procédé d'identification selon la revendication 23 pour la détection et l'identification de variation inter-tissulaire de séquence nucléique pour un fragment génomique d'intérêt.

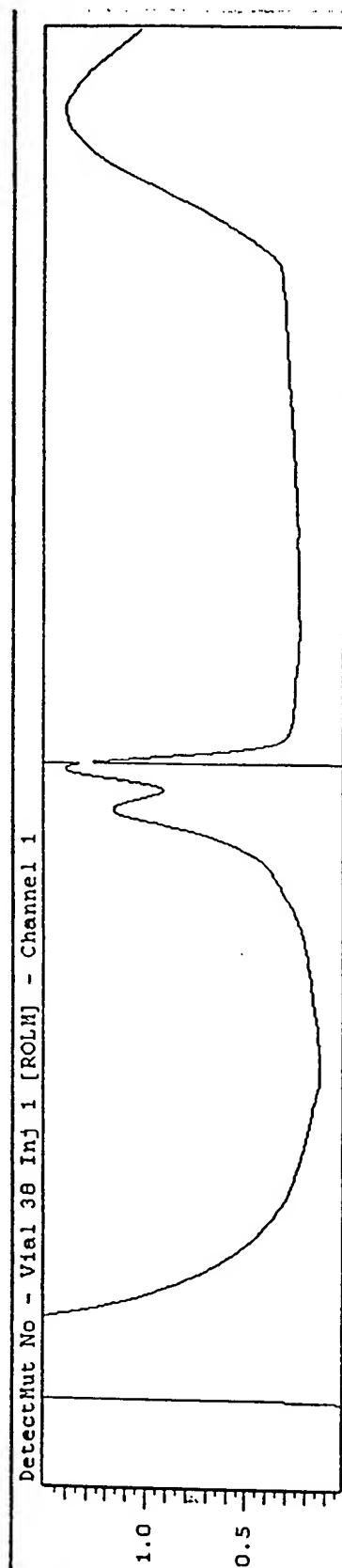




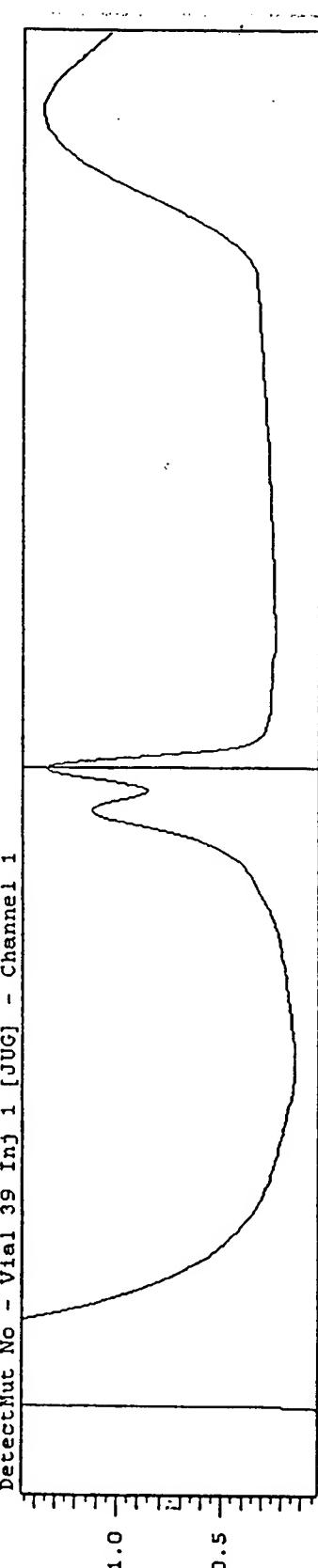
3/6



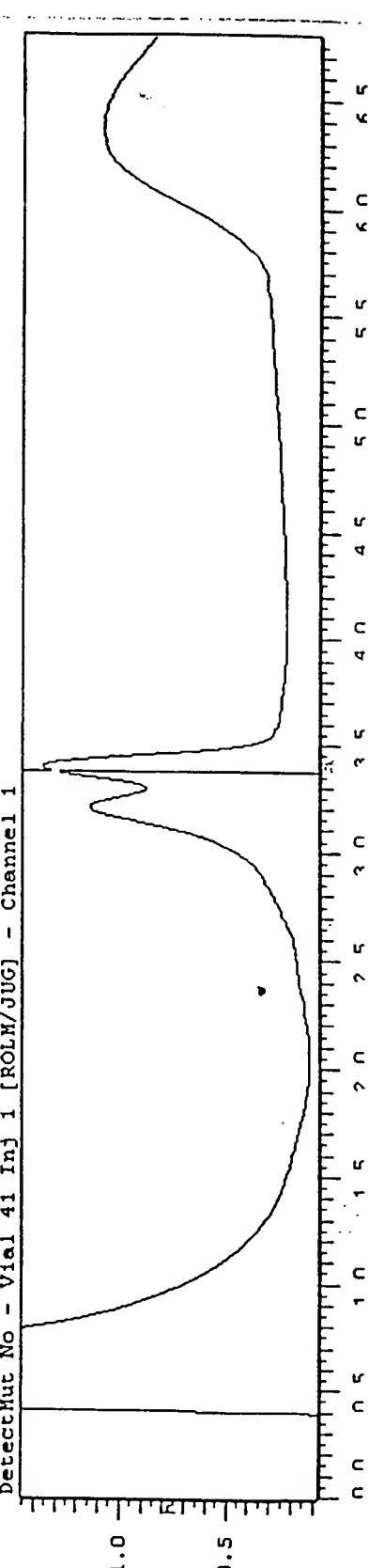
4/6



3A

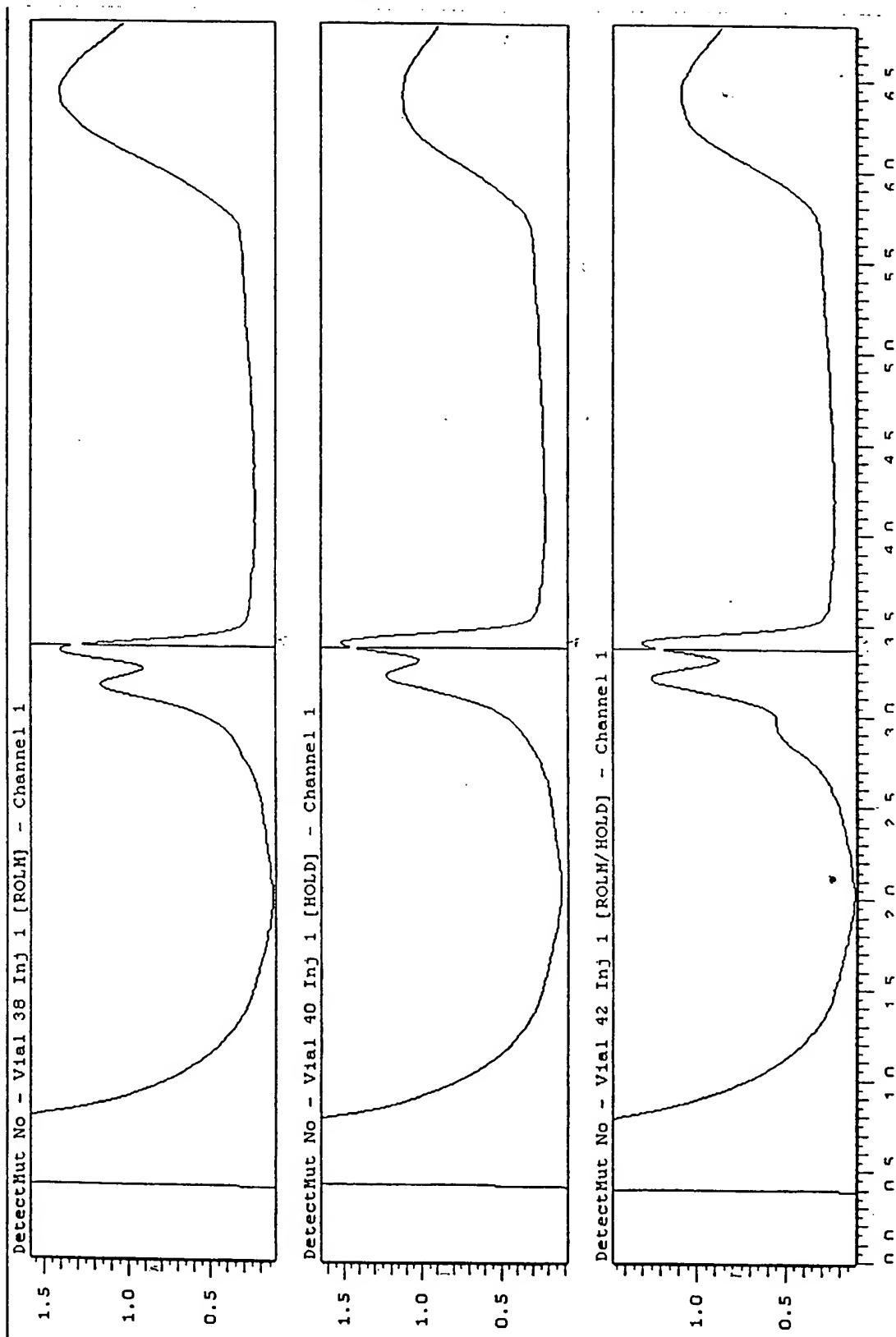


三



30

5/6

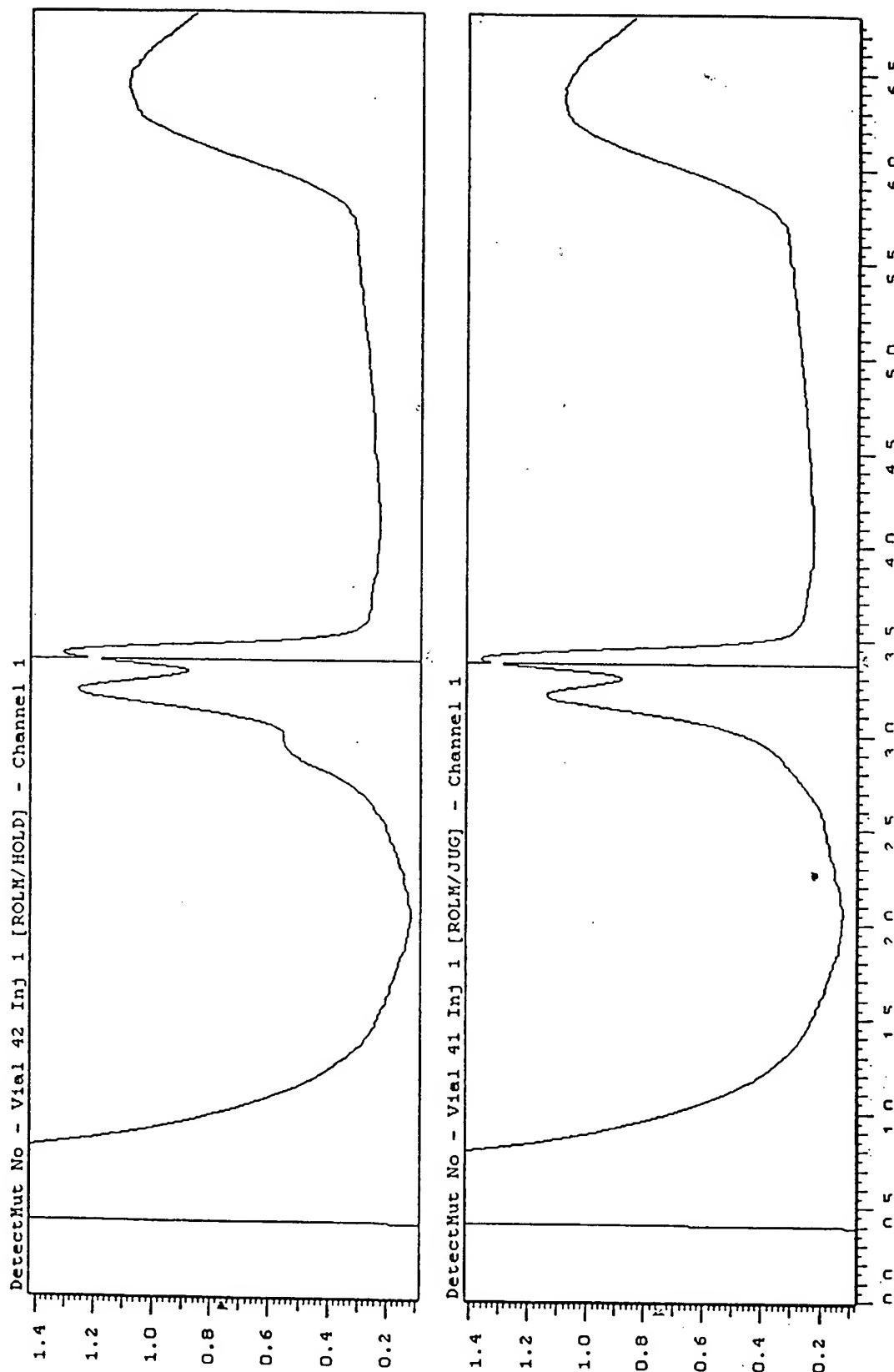


34A

34B

4C

6/6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 795 976 A (OEFNER PETER JOSEF ET AL) 18 August 1998 (1998-08-18) the whole document ---	1-28
Y	LIU W ET AL: "DENATURING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (DHPLC) USED IN THE DETECTION OF GERMLINE AND SOMATIC MUTATIONS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 6, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 1396-1400, XP002911657 ISSN: 0305-1048 cited in the application the whole document ---	1-28 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 September 2000

Date of mailing of the international search report

28/09/2000

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P. R. FR1A Patent Office

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No
PCT/FR 00/01198

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MANSUKHANI ET AL: "Convenient, nonradioactive heteroduplex based methods for identifying recurrent mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes" DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY, US, NEW YORK, NY, vol. 6, no. 4, August 1997 (1997-08), pages 229-237-237, XP002109367 the whole document ---	1-28
A	THOMPSON C T ET AL: "CYTOGENETIC PROFILING USING FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH) AND COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (CGH)" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, SUPPLEMENT, US, A.R. LISS, NEW YORK, NY, no. SUPPL. 17G, 1 January 1993 (1993-01-01), pages 139-143. XP000612761 ISSN 0733-1959 ---	
A	OEFNER P J ET AL: "COMPARATIVE DNA SEQUENCING BY DENATURING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (DHPLC)" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, US, NEW YORK, NY, October 1995 (1995-10), page COMPLETE01 XP002316094 ISSN 0002-9297 ---	
A	NOLLAU ET AL: "Methods for detection of point mutations" CLINICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, vol. 43, no. 7, 1997, pages 1114-1123-1128, XP002109368 ISSN 0009-9147 ---	
P, X	WO 97 54498 A (FOX JAYNE CATHERINE ; HAQUE IFTAKH ; GB); LITTLE STEPHEN (GB); ZENECA 24 October 1997 (1997-10-28) the whole document -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 00/01198

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5795976 A	18-08-1998	NONE	
WO 9954498 A	28-10-1999	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. Demande Internationale No
PCT/FR 00/01198

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 795 976 A (OEFNER PETER JOSEF ET AL) 18 août 1998 (1998-08-18) le document en entier ---	1-28
Y	LIU W ET AL: "DENATURING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (DHPLC) USED IN THE DETECTION OF GERMLINE AND SOMATIC MUTATIONS" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, GB, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 26, no. 6, 1 janvier 1998 (1998-01-01), pages 1396-1400, XP002911657 ISSN: 0305-1048 cité dans la demande le document en entier ---	1-28 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 septembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/09/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Fonctionnaire autorisé

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. *nde Internationale No*
PCT/FR 00/01198

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MANSUKHANI ET AL: "Convenient, nonradioactive heteroduplex based methods for identifying recurrent mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes" DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY, US, NEW YORK, NY, vol. 6, no. 4, août 1997 (1997-08), pages 229-237-237, XP002109367 le document en entier ---	1-28
A	THOMPSON C T ET AL: "CYTOGENETIC PROFILING USING FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH) AND COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION (CGH)" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, SUPPLEMENT, US, A.R. LISS, NEW YORK, NY, no. SLPPL. 17G, 1 janvier 1993 (1993-01-01), pages 139-143. XP000612761 ISSN 0733-1959 ---	
A	OEFNER P J ET AL: "COMPARATIVE DNA SEQUENCING BY DENATURING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (DHPLC)" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, US, NEW YORK, NY, octobre 1995 (1995-10), page COMPLETE01 XP002916094 ISSN 0002-9297 ---	
A	NELLAU ET AL: "Methods for detection of point mutations" CLINICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, vol. 43, no. 7, 1997, pages 1114-1128, XP002109368 ISSN 0009-9147 ---	
P, X	WE 99 54498 A (FOX JAYNE CATHERINE ; HAQUE KEMAL (GB); LITTLE STEPHEN (GB); ZENECA) 28 octobre 1999 (1999-10-28) le document en entier -----	1-28

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document Internationale No

PCT/FR 00/01198

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5795976	A 18-08-1998	AUCUN	
WO 9954498	A 28-10-1999	AUCUN	